

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JC675 U.S.PTO
09/441055
11/16/99



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 1998年11月17日

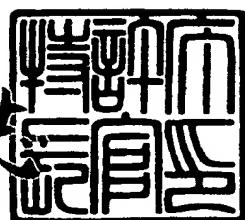
出願番号
Application Number: 平成10年特許願第326717号

出願人
Applicant(s): 味の素株式会社

1999年 6月11日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



【書類名】 特許願
【整理番号】 P-6041
【提出日】 平成10年11月17日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12P 13/06
【発明の名称】 発酵法によるL-メチオニンの製造法
【請求項の数】 11
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内
【氏名】 白田 佳弘
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内
【氏名】 倉橋 修
【特許出願人】
【識別番号】 000000066
【氏名又は名称】 味の素株式会社
【代理人】
【識別番号】 100089244
【弁理士】
【氏名又は名称】 遠山 勉
【選任した代理人】
【識別番号】 100090516
【弁理士】
【氏名又は名称】 松倉 秀実
【選任した代理人】
【識別番号】 100100549
【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 03-3669-6571

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 発酵法によるL-メチオニンの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。

【請求項2】 細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強され、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。

【請求項3】 L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強され、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。

【請求項4】 さらに細胞内のS-アデノシルメチオニンシンテース活性が弱化した請求項1～3のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項5】 ホモセリントランスサクシニラーゼ活性の増強が、前記微生物細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は同遺伝子の発現調節配列を増強することによるものである請求項2～4記載の微生物。

【請求項6】 L-メチオニンとS-アデノシルメチオニンによる協奏阻害が解除されたホモセリントランスサクシニラーゼを保持する請求項1又は4に記載の微生物。

【請求項7】 L-スレオニン要求性を示すことを特徴とする請求項1～6のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項8】 細胞内のシスタチオニンγ-シンテース活性及びアスパルトキナーゼホモセリンデヒドロゲナーゼII活性が増強された請求項1～7のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項9】 エシェリヒア属に属することを特徴とする請求項1～8のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項10】 請求項1～9のいずれか一項に記載の微生物を培地に培養し、培地中にL-メチオニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することを特徴とするL-メチオニンの製造法。

【請求項 11】 配列番号 26 に示すアミノ酸配列において、27位のアルギニンがシステインに置換する変異、296位のイソロイシンがセリンに置換する変異、298位のプロリンがロイシンに置換する変異、27位のアルギニンがシステインに置換しかつ296位のイソロイシンがセリンに置換する変異、296位のイソロイシンがセリンに置換しかつ298位のプロリンがロイシンに置換する変異、298位のプロリンがロイシンに置換しかつ27位のアルギニンがシステインに置換する変異、又は、27位のアルギニンがシステインに置換し、296位のイソロイシンがセリンに置換しかつ298位のプロリンがロイシンに置換する変異のいずれかに相当する変異を有するアミノ酸配列を有し、L-メチオニンと S-アデノシルメチオニンによる協奏阻害が解除されたホモセリントランスサクシニラーゼをコードする DNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、発酵法による L-メチオニンの製造法に関する。L-メチオニンは、医薬等として重要なアミノ酸である。

【0002】

【従来の技術】

メチオニンは、工業的には化学合成により製造される D L 体が中心となっている。L 体が必要な場合は、この D L 体をアセチル化して N-アセチル-D L-メチオニンとし、酵素的に L 体だけを脱アセチル化することによって製造される。

【0003】

一方、発酵法による L-メチオニンの製造については、メチオニンアナログ耐性変異株を用いる方法が報告されているが、生産量は少なく、また L-メチオニン生産に影響を与える因子は明らかではないため、最も発酵生産が困難なアミノ酸の一つである。例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli* (E. coli) K-12 株) を用いる方法が、公開特許公報昭 56-35992 あるいは文献 (Chattapadhyay, M. K. et al., *Med. Sci. Res.* 23, 775 (1995), Chattapadhyay, M. K. et al., *Biotechnol. Lett.* 17, 567-570 (1995)) に報告されているが、

いずれもL-メチオニンの生産量は工業的に用いるには不十分であった。

【0004】

*E. coli*においては、L-メチオニンの生合成経路は、L-スレオニンの生合成経路と一部共通であり、L-ホモセリンが共通の中間体となっている。L-ホモセリンからL-メチオニンへの固有経路の第一段階は、ホモセリントラスサクシニラーゼ (HTS) によって触媒されるが、同酵素は最終生産物であるL-メチオニンとL-メチオニンの代謝物であるS-アデノシルメチオニンにより協奏的な阻害を受けることが知られている (Lee, L.-W. et al., *J. Biol. Chem.* 241, 5479-5480 (1966))。

【0005】

*E. coli*のホモセリントラスサクシニラーゼをコードする遺伝子である`metA`配列は、ダクロスらにより報告されており (Duclos, B. et al., *Nucleic Acids Res.* 17, 2856 (1989))、`metA`の変異株の取得についても、L-メチオニンのアナログである α -メチル-D L-メチオニン (MM) に対する耐性を利用した方法が知られている (Chattopadhyay, M. K. et al., *J. Gen. Microbiol.* 137, 685-691 (1991))。しかし、MM耐性株の`metA`遺伝子産物であるホモセリントラスサクシニラーゼが、L-メチオニンとS-アデノシルメチオニン (SAM) による阻害解除型となるという報告は、サルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*)においてなされているが (Lawrence, D. A. et al., *J. Bacteriol.* 109, 8-11 (1972))、変異型`metA`遺伝子の塩基配列の報告はない。さらに、`metA`の単独変異株は、L-メチオニンを排出しないと報告されている (Chattopadhyay, M. K. et al., *J. Gen. Microbiol.* 137, 685-691 (1991))。

【0006】

`metA`を含めて、ホモセリントラスサクシニラーゼによる反応以降のL-メチオニンの固有生合成経路の酵素遺伝子の発現は、`metJ`遺伝子産物であるリプレッサーによる抑制を受けることも明らかとなっている (Greene, R. C., *Biosynthesis of Methionine*, in "Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition", ed. Neidhardt, F. D., ASM Press, pp. 542-560 (1996).)。`metJ`遺伝子は、L-メチオニンへの固有生合成経路の第二の酵

素シスタチオニンγ-シンテースをコードするmetB遺伝子と、アスパルトキナーゼ-ホモセリンデヒドロゲナーゼII (AK-HDII) をコードするmetLとからなるmetBLオペロンと、逆向きに隣接していることが知られている (Duchange, N. et al., J. Biol. Chem. 258, 14868-14871 (1983))。

【0007】

L-メチオニンからS-アデノシルメチオニンへの代謝反応を触媒するS-アデノシルメチオニン合成酵素をコードするmetKは、必須遺伝子であることが示唆されている (Greene, R. C., Biosynthesis of Methionine. in "Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition", ed. Niedhardt, F. D., ASM Press, pp. 542-560 (1996))。また、metKの変異株は、DL-ノルロイシンやエチオニンなどのメチオニンアナログ耐性により得られることが知られるとともに (Chattopadhyay, M. K. et al., J. Gen. Microbiol. 137, 685-691 (1991))、L-メチオニンへの固有生合成経路の酵素の発現を上昇させることができと報告されている (Greene, R. C. et al., J. Bacteriol. 115, 57-67 (1973))。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

上記のように、L-メチオニン生合成に関与する酵素やその遺伝子について、ある程度の報告はあるが、L-メチオニンの発酵生産に直接結びつく知見はほとんど得られておらず、L-メチオニン生産菌育種への応用もほとんどなされていない。

【0009】

本発明は、上記現状に鑑みなされたものであり、L-メチオニン生産に影響を与える因子を明らかにしてL-メチオニン生産菌を育種し、発酵法によるL-メチオニンの生産を可能とすることを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために銳意検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

【0011】

- (1) L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。
- (2) 細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強され、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。
- (3) L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強され、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物。

【0012】

- (4) さらに細胞内のS-アデノシルメチオニンシンテース活性が弱化した前記(1)～(3)のいずれかの微生物。
- (5) ホモセリントランスサクシニラーゼ活性の増強が、前記微生物細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は同遺伝子の発現調節配列を増強することによるものである(2)～(4)の微生物。
- (6) L-メチオニンとS-アデノシルメチオニンによる協奏阻害が解除されたホモセリントランスサクシニラーゼを保持する(1)又は(4)に記載の微生物。
- (7) L-スレオニン要求性を示すことを特徴とする(1)～(6)のいずれかの微生物。
- (8) 細胞内のシスタチオニンγ-シンテース活性及びアスパルトキナーゼ-ホモセリンデヒドロゲナーゼII活性が増強された(1)～(7)のいずれかの微生物。
- (9) エシェリヒア属に属することを特徴とする(1)～(8)のいずれかの微生物。

【0013】

- (10) 前記(1)～(10)のいずれかの微生物を培地に培養し、培地中にL-メチオニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することを特徴とするL

ーメチオニンの製造法。

【0014】

(11) 配列番号26に示すアミノ酸配列において、27位のアルギニンがシステインに置換する変異、296位のイソロイシンがセリンに置換する変異、298位のプロリンがロイシンに置換する変異、27位のアルギニンがシステインに置換しかつ296位のイソロイシンがセリンに置換する変異、296位のイソロイシンがセリンに置換しかつ298位のプロリンがロイシンに置換する変異、298位のプロリンがロイシンに置換しかつ27位のアルギニンがシステインに置換する変異、又は、27位のアルギニンがシステインに置換し、296位のイソロイシンがセリンに置換しかつ298位のプロリンがロイシンに置換する変異のいずれかに相当する変異を有するアミノ酸配列を有し、L-メチオニンとS-アデノシルメチオニンによる協奏阻害が解除されたホモセリントランスサクシニラーゼをコードするDNA。

【0015】

本明細書において、S-アデノシルメチオニンを「SAM」、 α -メチル-DL-メチオニンを「MM」、DL-ノルロイシンを「NL」と呼ぶことがある。また、S-アデノシルメチオニンシンテースを「SAM合成酵素」、ホモセリントラ nsサクシニラーゼを「HTS」ということがある。また、E. coliのmetB遺伝子産物シスタチオニン γ -シンテースを「シスタチオニン合成酵素」、metL遺伝子産物「アスパルトキナーゼ-ホモセリンデヒドロゲナーゼII」をAK-HDIIと呼ぶことがある。

【0016】

本発明において「L-メチオニン生産能」とは、本発明の微生物を培地に培養したときに、培地中にL-メチオニンを蓄積する能力をいう。

【0017】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の微生物は、L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物、又は、細胞内のホモセリントラ nsサクシニラーゼ活性が増強され、かつ、L-メチオニン生産能を有する微生物である

。本発明の微生物は、L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、かつ、細胞内のホモセリントランスサクシニラーゼ活性が増強されていることが好ましい。

さらに、本発明の微生物は、細胞中のSAM合成酵素活性が弱化していることが好ましい。

【0018】

上記のような微生物としては、L-ホモセリンからアシル転移反応により生じるO-アシルホモセリンを経てL-メチオニン及びSAMを産生する経路を有し、該アシル転移酵素の発現がリプレッサーによる抑制によって制御されるものであれば、特に制限されない。そのような微生物としては、エシェリヒア属細菌、コリネ型細菌、バチルス属細菌等の細菌が挙げられるが、エシェリヒア属細菌、例えばE. coliが好ましい。

【0019】

また、本発明の微生物は、E. coliのように、それが保持するHTSがL-メチオニン及びSAMによる協奏阻害を受けるものであれば、その阻害を解除することによって、L-メチオニン生産能を向上させることができる。

【0020】

メチオニン生合成の固有経路は、E. coli等多くの微生物のようにシスタチニオンを経由するものと、ブレビバクテリウム・フラバムのようにシスタチオニンを経由しないものがある (Ozaki, H. et al., J. Biochem., 91, 1163, (1982)) が、本発明においては、シスタチニオンを経由する経路を有するものが好ましい。そのような微生物においては、細胞内のシスタチオニン合成酵素活性を増強することにより、L-メチオニン合成能を強化することができる。なお、ブレビバクテリウム・フラバムのような微生物であっても、L-メチオニン生合成系のリプレッサーの欠損又は/及びHTSの増強によって、L-メチオニン生産能を高めることができる。

【0021】

さらに、上記微生物において、L-メチオニン生合成及びL-スレオニン生合成の共通経路に関与するアスパルトキナーゼ活性又はホモセリンデヒドロゲナー

ゼ活性の少なくとも一方を増強することによって、一層L-メチオニン生産能を高めることができる。

【0022】

上記の各特性の2以上を微生物に付与する場合、その順序は特に制限されず、任意の順序で付与することができる。また、複数の遺伝子を微生物に導入する場合、それらの遺伝子は同じベクターに搭載してもよく、複数の異なるベクターに別個に搭載してもよい。尚、複数のベクターを用いる場合は、異なる薬剤マーカー、及び異なる複製起点を有するベクターを用いることが好ましい。

以下に、上記の各特性を微生物に付与する方法を説明する。

【0023】

<1>L-メチオニン生合成系のリプレッサーの欠損

微生物のL-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損させるには、微生物に変異処理を施し、同リプレッサーを産生しなくなった株を選択することにより、行うことができる。変異処理は、微生物の変異株の取得に通常用いられている方法、例えば紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくは亜硝酸等の突然変異に用いられている変異剤により行うことができる。

【0024】

また、微生物の染色体DNA上の前記リプレッサーをコードする遺伝子を破壊することによっても、同リプレッサーを欠損させることができる。遺伝子の破壊は、コード領域又は発現調節配列の少なくとも一部を欠失した欠失型遺伝子を作製し、該欠失型遺伝子と染色体上の遺伝子との相同組換えを起こさせ、染色体上の遺伝子を欠失型遺伝子で置換することによって行うことができる(遺伝子置換)。

【0025】

リプレッサー遺伝子は、例えば、*E. coli*のL-メチオニン生合成系のリプレッサーをコードする遺伝子(*metJ*)の塩基配列は知られているので(Duchange, N. et al., *J. Biol. Chem.* 258, 14868-14871 (1983))、該塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いたPCRにより、染色体DNAから単離することが

できる。こうして得られる遺伝子断片から一定の領域を制限酵素により切り出し、コード領域又は発現調節領域の少なくとも一部を欠失させることによって、欠失型遺伝子を作製することができる。

【0026】

遺伝子置換は、例えば次のようにして行うことができる。温度感受性複製起点を有するベクターに欠失型遺伝子を搭載させて組換えベクターを調製し、同組換えベクターで微生物を形質転換し、欠失型遺伝子と染色体DNA上の遺伝子との相同組換えにより染色体DNA上の遺伝子に欠失型遺伝子を挿入させる。その後に、形質転換株を前記ベクターが複製できない温度で培養し、細胞質中のベクターを脱落させる。さらに、染色体上の1コピーの遺伝子をベクターとともに脱落させることにより、遺伝子が置換される。目的の遺伝子置換が生じていることは、遺伝子置換株の染色体DNAをサザン・ハイブリダイゼーションにより解析することにより、確認することができる。

【0027】

E. coli用の温度感受性複製起点を有するベクターとしては、例えば特願平9-194603号に記載のプラスミドpMAN997等が、また、コリネ型細菌用の温度感受性複製起点を有するベクターとしては、例えば特開平5-7491号公報に記載のプラスミドpHSC4等が挙げられるが、これらに限定されず、他のベクターを用いることもできる。

【0028】

前述したようにE. coliでは、metJ遺伝子は、metB遺伝子とmetL遺伝子とからなるmetBLオペロンと、逆向きに隣接していることが知られている (Duchange, N. et al., J. Biol. Chem. 258, 14868-14871 (1983))。したがって、欠失型metJ遺伝子に、適当なプロモーター配列を連結し、上記と同様に遺伝子置換を行うことによって、metJ遺伝子の破壊と、metBLオペロンのプロモーター置換による発現改善とを、一度の相同組換えによって行うことができる。metBLオペロンの発現が向上すると、細胞内のシスタチオニン合成酵素活性及びAK-HDII活性が増強される。

【0029】

具体的には、*E. coli*、例えばW3110株染色体DNAを錆型とし、配列番号5及び配列番号6記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR反応 (polymerase chain reaction; White, T.J. et al.; Trends Genet., 5, 1 85 (1989)) により得られるmetB遺伝子を含む約1kbの断片と、配列番号7及び配列番号8に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR反応により得られるmetJ遺伝子の下流部分を含む約1kbの断片と、配列番号9及び配列番号10に示すオリゴヌクレオチドをアニールして得られるスレオニンオペロンのプロモーター配列を有する配列の三者を、適当なベクターに挿入して連結することによって、metJの構造遺伝子が消失し、metBLオペロンのプロモーターがスレオニンプロモーターに置換した構造を有するDNA断片を含む組換えベクターを得ることができる。

【0030】

上記のようにして調製した組換えベクターを微生物に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリK-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. et al., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) があり、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法 (Duncan, C. H. et al., Gene, 1, 153 (1977)) がある。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法 (Chang, S. et al., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M. J. et al., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)) も応用できる。また、コリネ型細菌の形質転換は、電気パルス法 (特開平2-207791号公報参照) によって行うことができる。

【0031】

metJ、metBL、あるいは後述のmetA、metK及びthrBC等の各遺伝子のクローニング等に用いるベクターとしては、例えば*E. coli*細胞内で自律複製可能なプラス

ミド、具体的にはpUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG399、pHSG398、RSF1010等が挙げられる。また、ファージベクターを用いてもよい。E. coli以外の微生物を用いる場合は、同微生物及びE. coliにおいて自律複製可能なシャトルベクターを用いることが好ましい。例えば、コリネ型細菌で自律複製可能なプラスミドとしては、以下のものが挙げられる。

【0032】

p AM 330	特開昭58-67699号公報参照
p HM 1519	特開昭58-77895号公報参照
p AJ 655	特開昭58-192900号公報参照
p AJ 611	同 上
p AJ 1844	同 上
p CG 1	特開昭57-134500号公報参照
p CG 2	特開昭58-35197号公報参照
p CG 4	特開昭57-183799号公報参照
p CG 11	同 上
p HK4	特開平5-7491号公報参照

【0033】

遺伝子断片とベクターを連結して組み換えDNAを調製するには、遺伝子断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。

その他、染色体DNAの調製、染色体DNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断及び連結、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に記載されている。

【0034】

<2>HTS活性の増強、及び変異型HTSの付与

微生物細胞内のHTS活性は、前記微生物細胞内のHTSをコードする遺伝子

断片を、同微生物で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組み換えDNAを作製し、これを前記微生物に導入して形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のHTSをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、HTS活性が増強される。E. coliでは、HTSはmeta遺伝子にコードされている。微生物としてエシェリヒア属細菌を用いる場合、導入するHTS遺伝子は、エシェリヒア属細菌由来の遺伝子を用いることが好ましいが、ホモセリントランスアセチラーゼを有するコリネ型細菌等の他の微生物由来の遺伝子を使用することもできる。

【0035】

HTS活性の増強は、HTS遺伝子を微生物宿主の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。コリネバクテリウム属細菌に属する微生物の染色体DNA上にHTS遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペッティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、HTS遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。いずれの方法によっても形質転換株内のHTS遺伝子のコピー数が上昇する結果、HTS活性が増強される。

【0036】

HTS活性の増強は、上記の遺伝子増強による以外に、HTS遺伝子の発現調節配列を増強することによっても達成される。具体的には、染色体DNA上又はプラスミド上のHTS遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換する（特開平1-215280号公報参照）。たとえば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのP_Rプロモーター、P_Lプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。これらのプロモーターへの置換により、HTS遺伝子の発現が強化されることによってHTS活性が増強される。

【0037】

*E. coli*のHTS遺伝子(*metA*)は、その塩基配列が知られているので(Blattner, F. R. et al., *Science*, 277, 1453-1462 (1997))、該塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いたPCRにより、染色体DNAから単離することができる。そのようなプライマーとして具体的には、配列番号21及び配列番号22に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0038】

上記のようにして微生物細胞内のHTS活性を増強することによって、L-メチオニン生合成が強化され、L-メチオニンの生成量を増加させることができると考えられる。

【0039】

また、HTSは、L-メチオニンとSAMによる協奏的阻害を受けるので、この協奏阻害が解除されたHTSを微生物に保持させることによっても、L-メチオニン生合成系を強化することができる。前記協奏阻害が解除されたHTSを微生物に保持させることは、微生物に変異処理を施し、同協奏阻害が解除されたHTSを産生する株を選択することにより、行うことができる。変異処理は、微生物の変異株の取得に通常用いられている方法、例えば紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくは亞硝酸等の突然変異に用いられている変異剤により行うことができる。ここで、「L-メチオニンとSAMによる協奏阻害を解除されたHTS」とは、L-メチオニン及びSAMの非存在下における酵素活性に対するL-メチオニンもしくはSAM、又はL-メチオニン及びSAMの存在下での酵素活性の比(残存率)が、野生型HTSのそれよりも高いHTSをいう。具体的には、例えば、1 mMのL-メチオニン存在下での残存率が40%以上、好ましくは80%以上、1 mMのSAM存在下での残存率が10%以上、好ましくは50%以上、又は、それぞれ0.1 mMのL-メチオニン及びSAMの存在下での活性が15%以上、好ましくは60%以上であるHTSは、L-メチオニンとSAMによる協奏阻害を解除されたHTSである。

【0040】

上記のような変異型HTSを保持する変異株は、親株を α -メチル-DL-メチオニン(MM)存在下で、例えば1 g/lのMMを含む培地で培養し、生育する株を

選択することにより、取得することができる。MMによる選択は、複数回繰り返してもよい。

【0041】

変異型HTSを保持する変異株は、上記のようにして得られるHTS変異株から変異型HTS遺伝子（変異型meta）をクローニングし、同変異型遺伝子で微生物を形質転換することによっても、取得することができる。変異型HTS遺伝子の単離、及び同遺伝子の微生物への導入は、前記の野生型HTS遺伝子と同様にして行うことができる。変異型meta遺伝子として具体的には、配列番号26に示すアミノ酸配列において、27位のアルギニンがシスティンに置換する変異、296位のイソロイシンがセリンに置換する変異、又は298位のプロリンがロイシンに置換する変異のいずれかに相当する変異を有するHTSが挙げられる。また、これらの変異の任意の2種又は3種を有するHTSも、好ましい変異型HTSである。

【0042】

<3> SAM合成酵素活性の弱化

さらに、細胞内のSAM合成酵素活性を弱化させることにより、微生物のL-メチオニン生産能を上昇させることができる。SAM合成酵素活性を欠損させることによっても、微生物のL-メチオニン生産能を上昇させることができるが、その場合は微生物を培養する培地にSAMを含有させる必要があるので、SAM合成酵素活性を弱化させることが好ましい。ここで、「SAM合成酵素活性を弱化させる」とは、微生物細胞タンパク質当たりのSAM合成酵素の比活性が、野生型SAM合成酵素を保持する株よりも低いことをいう。具体的には、弱化の程度は、野生株のSAM合成酵素に比べて80～50%、好ましくは50～30%、より好ましくは30～10%程度が挙げられる。E. coliでは、SAM合成酵素の比活性が10%より低下すると、細胞分裂が阻害されることが示唆されている（Newman, E. B. et al., J. Bacteriol., 180, 3614-3619 (1998)）。

【0043】

SAM合成酵素活性が弱化した微生物は、酵素タンパク質当たりの比活性が低下したSAM合成酵素（弱化型SAM合成酵素）を產生するものであってもよい

し、SAM合成酵素遺伝子の転写効率又は翻訳効率が低下したことにより、酵素の発現効率が低下したものであってもよい。

【0044】

SAM合成酵素活性が弱化した変異株は、親株をDL-ノルロイシン（N L）存在下で、例えば0.1g/lのN Lを含む培地で培養し、生育する株を選択することにより、取得することができる。N Lによる選択は、複数回繰り返してもよい。また、DL-ノルロイシンの代わりにエチオニン又は γ -グルタミルメチルエステルを用いることも可能である。

【0045】

弱化型SAM合成酵素を保持する変異株は、上記のようにして得られるSAM合成酵素弱化株から弱化型SAM合成酵素遺伝子をクローニングし、同変異型遺伝子で微生物染色体上の野生型SAM合成酵素遺伝子を置換することによっても、取得することができる。SAM合成酵素遺伝子の遺伝子置換は、前記のmetJ遺伝子と同様にして行うことができる。E. coliのSAM合成酵素遺伝子（metK）は、その塩基配列が知られているので（Blattner, F. R. et al., Science, 277, 1453-1462 (1997)）、該塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いたPCRにより、染色体DNAから単離することができる。そのようなプライマーとして具体的には、配列番号11及び配列番号12に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。得られたmetK遺伝子に変異が生じていることは、該遺伝子の塩基配列を決定し、公知の野生型metK遺伝子の塩基配列と比較することにより、確認することができる。

【0046】

弱化型SAM合成酵素をコードする遺伝子として具体的には、配列番号18に示すアミノ酸配列において、303番目のイソロイシンがロイシンに置換する変異、185番目のバリンがグルタミン酸に置換する変異、378番目のアルギニン以降がアラニン-メチオニン-ロイシン-プロリン-バリン（配列番号29）からなる配列に変化する変異のいずれかに相当する変異を有するSAM合成酵素が挙げられる。

【0047】

<4>L-スレオニン要求性

微生物にL-スレオニン要求性を付与することにより、L-メチオニン生産能を向上させることができる。L-スレオニン要求性を示す微生物として具体的には、L-ホモセリンからL-スレオニンに至るL-スレオニン生合成の固有経路に関与する酵素にいずれかが欠損した微生物が挙げられる。E. coliにおいては、L-スレオニンの生合成に関与する酵素の遺伝子は、スレオニンオペロン(*thrABC*)として存在し、*thrBC*部分を欠失させることによってL-ホモセリン以降の生合成能を失ったL-スレオニン要求株を取得することができる。尚、*thrA*遺伝子はL-メチオニン及びL-スレオニンの共通経路の酵素であるアスパルトキナーゼのアイソザイムの一つをコードしており、欠失させないことが好ましい。

【0048】

*thrBC*を欠失させるには、染色体DNA上のスレオニンオペロン中の*thrBC*部分を破壊すればよい。*thrBC*の破壊は、一部を欠失した*thrBC*で微生物染色体上の*thrBC*部分を置換することによって行うことができる。*thrBC*の遺伝子置換は、前記*metJ*遺伝子の遺伝子置換と同様に行えばよい。欠失を含む*thrBC*は、E. coli染色体DNAを鑄型とし、配列番号1及び2に示す塩基配列を有するプライマーを用いてPCRにより*thrB*遺伝子の上流部分を含む約1kbの断片を増幅し、同様に配列番号3及び4に示す塩基配列を有するプライマーを用いてPCRにより*thrC*遺伝子の下流部分を含む約1kbの断片を増幅し、これらの増幅断片を連結することによって取得することができる。

【0049】

<5>L-メチオニンの製造

上記のようにして得られるL-メチオニン生産能を有する微生物を培地に培養し、該培地中にL-メチオニンを生産蓄積せしめ、これを該培地から採取することにより、L-メチオニンを製造することができる。

【0050】

使用する培地は、微生物に応じて従来より用いられてきた周知の培地を用いてかまわない。つまり、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地である。本発明を実施するための特別な培地は必要と

されない。

【0051】

炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースやでんぶんの加水分解物などの糖類、グリセロールやソルビトールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類等を用いることができる。

【0052】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

【0053】

有機微量栄養源としては、ビタミンB1、L-スレオニン、L-チロシンなどの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

【0054】

培養は、利用される微生物に応じて従来より用いられてきた周知の条件で行ってかまわない。例えば、好気的条件下で16~120時間培養を実施するのがよく、培養温度は25℃~45℃に、培養中pHは5~8に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

【0055】

培養終了後の培地液からのL-メチオニンの採取は、本願発明において特別な方法が必要とされることはない。すなわち、本発明は従来より周知となっているイオン交換樹脂法、沈澱法その他の方法を組み合わせることにより実施できる。

【0056】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0057】

【実施例1】 エシェリヒア・コリW3110株からのL-スレオニン要求株及び

etJ欠損株の取得

<1>欠失を有するthrBC構造遺伝子を含む組換え用プラスミドの調製

ゲノムDNA精製キット（アドバンスドジェネティクテクノロジー社製）を用い、その指示に従ってE. coliの野生型K-12株の誘導体であるW3110株から染色体DNAを調製した。配列表の配列番号1及び配列番号2に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成した。これをプライマーとし、前記染色体DNAを鑄型として、エルリッチらの方法（PCR Technology-Principles and Applications for DNA Amplification, ed. Erlich, H. A., Stockton Press）に従って、PCR反応を行い、thrB遺伝子の上流部分を含む約1kbの断片の増幅を行った。この増幅断片は、両端にプライマーに由来するEcoRI及びSalIの認識配列が導入されている。得られた増幅断片を、導入した認識部位を切断する制限酵素で切断した。

【0058】

同様に、配列番号3及び配列表番号4に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行い、thrC遺伝子の下流部分を含む約1kbの断片の増幅を行った。この増幅断片は、両端にプライマーに由来するSalI及びHindIIIの認識配列が導入されている。得られた増幅断片を、導入した認識部位を切断する制限酵素で切断した。上記2つの増幅断片と、EcoRI及びHindIIIで切断したpHSG398（宝酒造社製）とを、ライゲーションキット（宝酒造）を用いて連結し、E. coli JM109コンピテントセル（宝酒造）を形質転換した。形質転換体からプラスミドを、プラスミド抽出機PI-50（倉敷紡績社製）を用いてアルカリ法（Boirnboim, H. C. et al., Nucleic Acids Res., 7, 1513-1523 (1979)）に基づいて調製した。得られた組換えプラスミドから、EcoRI及びHindIII認識部位に2つの断片がSalI認識部位を介して挿入されたプラスミドを、挿入断片の長さによって選択した。このプラスミドは、thrBCの構造遺伝子の上流と下流を含んでおり、thrBCの構造遺伝子のほぼ全長が欠失した遺伝子断片を含んでいる。

【0059】

<2>遺伝子組換えによるthrBC構造遺伝子欠損株の作製

上記プラスミドと、特願平9-194603号に記載の温度感受性複製起点を有するプラスミドpMAN997を、EcoRI及びHindIIIで切斷した後、これらを連結し、得られた組換えプラスミドでE. coli JM109株を形質転換した。形質転換体からプラスミドを抽出し、pMAN997にthrBC欠失遺伝子断片が挿入された構造を有するものを選択し、pMAN Δ BCとした。このプラスミドを用いてW3110株を形質転換し、常法に従って遺伝子組換えを行った。すなわち、組換え株の選択は、M9培地 (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual/Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, A.3 (1989)) におけるL-スレオニン要求性によって行い、得られたL-スレオニン要求株をW Δ BC株とした。

【0060】

<3>W3110株及びW Δ BC株からのmetJ欠損株の作製

次に、W3110株染色体DNAを鋳型とし、配列番号5及び配列番号6記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行い、metB遺伝子を含む約1kbの断片の増幅を行った。この増幅断片は、両端にEcoRI及びSphIの認識配列が導入されている。得られた増幅断片を、導入した認識部位を切斷する制限酵素で切斷した。

【0061】

同様に配列番号7及び配列番号8に記載の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行い、metJ遺伝子の下流部分を含む約1kbの断片の増幅を行った。この増幅断片は、両端にHindIII及びEcoRIの認識配列が導入されている。得られた増幅断片を、導入した認識部位を切斷する制限酵素で切斷した。

【0062】

次に、配列番号9に示した、両端にSphI及びHindIII認識部位を有し、スレオニンオペロンのプロモーター配列を有する配列を、配列番号10に示した相補鎖とともに合成し、これらをアニールさせた後に、制限酵素SphI及びHindIIIで切斷した。このようにして得たスレオニンプロモーター断片と、EcoRIで切斷したpHSG298（宝酒造社製）と、前記2つのPCR増幅断片とを混合した後、連結反応を行った。この連結反応液で、JM109株を形質転換し、形質転換体からプラスミド

を抽出した。得られた組換えプラスミドから、4者が連結されたプラスミドを選択した。このプラスミドは、*metJ*の構造遺伝子が消失し、*metBL*オペロンのプロモーターがスレオニンプロモーターに置き換わった構造を有している。

【0063】

上記で得られたプラスミド、及び特願平9-194603号に記載の温度感受性複製起点を有するプラスミドpMAN997をEcoRIで切断し、ライゲーションを行い、pMAN997に*metJ*消失断片が挿入された構造を有するものを選択し、pMANΔJとした。このプラスミドを用いてW3110株及びWΔBC株を形質転換し、常法に従って遺伝子組換えを行った。得られた組換え株は、菌体から調製したDNAを鋳型とし、配列番号6及び配列番号8に示したオリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCR法による增幅産物の長さで選択した。W3110株及びWΔBC株から得られた*metJ*消失株を、それぞれWΔJ株及びWΔBCΔJ株とした。

【0064】

組換えによる*metJ*消失の効果を確認するため、菌体から粗酵素抽出液を調製し、HTS及びシスタチオニン合成酵素の活性を測定した。W3110株とWΔJ株を2mlのLB培地に植菌し、37℃で一晩培養した。この培養液1mlを5,000rpmで10分間遠心分離し、菌体を0.9%の食塩水で2度洗浄した。得られた菌体を1mlの0.9%食塩水に懸濁し、そのうちの0.5mlを、50mlの5mMのL-メチオニンを含むデイビス-ミンジオリ最少培地 (Davis, B. D., and Mingioli, E. S., J. Bacteriol. 60, 17-28 (1950)) に植菌した。これを37℃で24時間培養し、培養液を8,000rpmで10分間遠心分離し、菌体を0.9%食塩水で2度洗浄した。菌体を3mlの1mMジチオスレイトールを含む50mMリン酸カリウムバッファー (pH7.5) に懸濁した。この懸濁液を超音波破碎機 (久保田社製) を用いて、4℃にて150Wで5分間細胞破碎処理を行った。破碎液を15,000rpmで30分間遠心処理した上清をセファデックスG-50カラム (ファルマシア社製) にて脱塩処理したものを粗酵素抽出液とした。粗酵素抽出液中のHTS活性とシスタチオニン合成酵素の活性を測定した。

【0065】

HTS活性は、粗酵素抽出液5μlを0.1Mリン酸カリウム (pH7.5)、1mMサクシニルコエンザイムA (シグマ社製)、0.2nM DL-[¹⁴C]ホモセリン (室町化学工

業社製)、及び0.2mM L-ホモセリンからなる反応液に加えて50μlとし、30℃で10分間反応を行った。反応液1μlを、セルロースプレート(メルク社製)にスポットし、アセトン、ブタノール、水、ジエチルアミンを10:10:5:2の割合で含む添加溶媒で展開した。プレートを風乾した後、イメージアナライザー(富士写真工業社製)にてオートラジオグラフィーを行った。

【0066】

シスタチオニン合成酵素は、L-システイン非存在下ではO-サクシニルホモセリンをα-ケト酪酸、アンモニア及びコハク酸を生じることが知られており、簡便な検出方法として利用できる(Holbrook, E. L. et al., Biochemistry 29, 435-442 (1990))。粗酵素抽出液100μlを、0.2Mトリス-塩酸(pH8)、5mM O-サクシニルホモセリン(シグマ社製)、及び0.25mMピリドキサルリン酸(シグマ社製)からなる反応液に加え1mlとし、37℃で20分間反応を行った後氷冷した。この反応液中のO-サクシニルホモセリンを逆相HPLC(ジーエルサイエンス社製)で定量し、粗酵素抽出液非添加の反応液から減少したO-サクシニルホモセリン量を算出した。ピリドキサルリン酸非添加の反応を同時にを行い、ピリドキサルリン酸依存のO-サクシニルホモセリン減少を、シスタチオニン合成酵素活性とした。

【0067】

上記のようにして測定したHTS活性とシスタチオニン合成酵素のそれぞれの比活性の測定結果を表1に示した。HTS活性はW3110株ではL-メチオニン添加の効果によりほとんど検出されないが、WΔJ株においては顕著な活性を示した。シスタチオニン合成酵素活性も、WΔJ株においてはW3110株に比して顕著な増大が認められた。これらの結果から組換えによるmetJ欠失とmetBLオペロンのプロモーター置換の効果が確認された。

【0068】

【表1】

表1: metJ欠損株におけるHTS活性及びシスタチオニン合成酵素活性

菌株	HTS活性 (mmol/min/mg蛋白質)	シスタチオニン合成酵素活性 (mmol/min/mg蛋白質)
W3110	0.3	140
WΔJ	126	1300

【0069】

【実施例2】 W3110株からのmetK変異株の取得

W3110株をLB培地 (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual/Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, A.1 (1989)) にて37°Cで一晩培養した。培養した培養液1mlを5,000rpmで10分間遠心分離し、菌体を0.9%の食塩水で2度洗浄した。得られた菌体を100μlの0.9%食塩水に懸濁し、そのうちの10μlを5mlの0.1g/lのDL-ノルロイシン (NL) を含むデイビス-ミニジオリ最少培地に植菌した。これを37°Cで5日間培養した。

【0070】

生育してきたコロニーの幾つかをLB寒天培地上でコロニー分離し、再度0.1g/lのNLを含むデイビス-ミニジオリ最小培地での生育を確認し、12株のNL耐性株を選抜した。これらの耐性株から染色体DNAを調製した。これを鋳型として配列番号11及び12に示す配列を有する2種のプライマーを用いてPCR反応を行いmetK遺伝子の增幅を行った。この增幅断片の塩基配列を、配列番号11及び12に示した增幅用プライマー、及び配列番号13、14、15、及び16に示す配列を有するプライマーを用いて決定した。塩基配列の決定はダイターミネーターサイクルシークエンシングキット (パーキンエルマー社製) を用いて、373S型DNAシークエンサー (パーキンエルマー社製) にてそれぞれの指示に従って行つ

た。対照として決定した野生株W3110の塩基配列はブラットナーらが報告しているmetKの配列 (Blattner, F. R. et al., Science, 277, 1453-1462 (1997)) と完全に一致した。この配列を配列番号17に示した。また、この配列がコードし得るSAM合成酵素のアミノ酸配列を配列番号18に示した。

【0071】

NL耐性株のうち、metKの構造遺伝子中に変異点が見いだされたものは12株の内3株あり、これらをWNL2、WNL24、及びWNL32と名付けた。これらの変異株のmetK塩基配列は、配列番号17に示す野生型の塩基配列上で、WNL2株では907番目のアデニンがシトシンに、WNL24株では554番目のチミンがアデニンに、WNL32株では1132番目のシトシン塩基の欠失が認められた。この結果、配列番号18に示したSAM合成酵素のアミノ酸配列において、WNL2株のSAM合成酵素は303番目のイソロイシンがロイシンに、WNL24株では185番目のバリンがグルタミン酸に、WNL32株では1塩基欠失によって378番目のアルギニン以降がアラニン-メチオニン-ロイシン-プロリン-バリンからなる配列に変化していることが明らかとなった。これらの株はSAM合成酵素活性が弱化していることが推定された。

【0072】

【実施例3】metK変異の導入と野生型metA遺伝子の増幅によるL-メチオニン生産

(1) WΔBCΔJ株へのmetK変異の導入

metK遺伝子変異株であるWNL2株、WNL24株、及びWNL32株の染色体DNAを鋳型とし、配列番号19及び配列番号20記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行い、metK遺伝子を含む約2.5kbの断片の増幅を行った。この増幅断片は両端にHindIIIの認識配列が導入されている。得られた増幅断片をそれぞれHindIIIで切断した。HindIIIで切断したpSTV28(宝酒造社製)及びPCR増幅断片を混合後連結反応を行い、JM109株を形質転換した。形質転換体からプラスミドを抽出した。得られた組換えプラスミドからPCR増幅断片が挿入されたプラスミドを選択した。これらのプラスミドはmetKの構造遺伝子に変異を有していることを塩基配列を決定し確認した。

【0073】

これらのプラスミドのHindIII切断断片を、HindIIIで切断したpMAN997にクローニングし、それぞれpMANK-2, pMANK-24, pMANK-32と名付けた。これらのプラスミドを用いてW Δ BC Δ J株を形質転換し、常法に従って遺伝子組換えを行った。組換え株から染色体DNAを抽出して鑄型とし、配列番号11及び配列番号12に示したオリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCR法による増幅産物の塩基配列を調べた。それぞれの変異が認められたものを選択した。得られたW Δ BC Δ J株由来のmetK変異株をそれぞれW Δ BC Δ JK-2株、W Δ BC Δ JK-24株、及びW Δ BC Δ JK-32株とした。

【0074】

(2) metA遺伝子の増幅

W3110株染色体DNAを鑄型とし、配列番号21及び配列番号22記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行い、metA遺伝子を含む約1kbの断片の増幅を行った。この増幅断片は両端にそれぞれSphI及びSalIの認識配列が導入されている。得られた増幅断片を、導入した認識部位を切断する制限酵素で切断した。これをSphI及びSalIで切断したpHSG398にクローニングした。挿入断片の塩基配列を配列番号21及び22に示した増幅用プライマー、並びに配列番号23及び24に示す配列を有するプライマーを用いて決定した。決定した野生株W3110のmetAの塩基配列はプラットナーらが報告しているmetAの配列(Blattner, F. R. et al., Science, 277, 1453-1462 (1997))と完全に一致した。この配列を配列番号25に示した。また、この配列がコードし得るHTSのアミノ酸配列を配列番号26に示した。

【0075】

このプラスミドのSphI及びSalIによる切断物、実施例1に記載のスレオニンプロモーターのHindIII及びSphIによる切断物、及びHindIII及びSalIで切断したpMW118(日本ジーン社製)を混合後、連結反応を行った。この反応液でJM109株を形質転換し、形質転換体からプラスミドを抽出した。得られた組換えプラスミドから3者が連結されたプラスミドを選択した。このプラスミドはスレオニンプロモーターの下流にmetA遺伝子が配置されており、スレオニンプロモーターにより

metAが発現する構造をとっている。このプラスミドをpMWPthmetA-Wと名付けた。このプラスミドを用いてW3110株、W△BC株、W△BC△J株、W△BC△JK-2株、W△BC△JK-24株、及びW△BC△JK-32株を形質転換し、形質転換体を得た。

【0076】

各形質転換体を50mg/lのアンピシリンを含むLBプレート上、37℃で一晩培養した。菌体をグルコース40g/l、硫酸マグネシウム1g/l、硫安16g/l、リン酸二水素カリウム1g/l、酵母抽出物 (Bacto Yeast-Extract (Difco)) 2g/l、硫酸マンガン0.01g/l、硫酸鉄0.01g/l、炭酸カルシウム30g/l、アンピシリン50mg/l、L-スレオニン0.5g/lを含むpH7の培地20mlに植菌し、37℃で48時間培養した。

【0077】

培養物から菌体を除き、アミノ酸分析計（日立社製）にてL-メチオニン量を測定した。この結果を表3に示した。W3110株では認められなかったL-メチオニンが、W△BC株、W△BC△J株において増加した。metKの変異は、W△BC△JK-2株ではL-メチオニン量は低下したものの、W△BC△JK-32株においては同等、W△BC△JK-24株では上昇が認められ、L-メチオニン生産に効果が認められた。プラスミドpMWPthmetA-Wを保持したW△BC△JK-24株は、プライベートナンバーAJ13425が付与され、平成10年5月14日より、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に寄託されており、受託番号F E R M P-16808が付与されている。

【0078】

【表2】

表2：野生型metA導入株のL-メチオニン生産量

菌株	生成量 (g/l)
W3110/pMWPthrmetA-W (metA ^c)	0.000
WΔBC/pMWPthrmetA-W (thrBC ⁻ , metA ^c)	0.008
WΔBCΔJ/pMWPthrmetA-W (metBL ^c , thrBC ⁻ , metA ^c)	0.022
WΔBCΔJK-2/pMWPthrmetA-W (thrBC ⁻ , metJ ⁻ , metBL ^c , metK ^l , metA ^c)	0.014
WΔBCΔJK-24/pMWPthrmetA-W (thrBC ⁻ , metJ ⁻ , metBL ^c , metK ^l , metA ^c)	0.141
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-W (thrBC ⁻ , metJ ⁻ , metBL ^c , metK ^l , metA ^c)	0.023

metK^l : 弱化型metK, metA^c : metA増強, metBL^c : metBL増強

【0079】

【実施例4】metA変異株及び阻害解除型metA遺伝子の取得

W3110株を2mlのLB培地に植菌し、37℃で8時間培養した。この培養液1mlを5,000rpmで10分間遠心分離し、菌体を0.9%の食塩水で2度洗浄した。得られた菌体を100μlの0.9%食塩水に懸濁し、そのうちの5μlを5mlの1g/lのα-メチル-DL-メチオニン(MM)を含むディビスマニジオリ最少培地に植菌した。これを37℃で3日間培養した。この培養液を適当に希釀の後、1g/lのMMを含むディビスマニジオリ最少培地に塗布し、37℃で一晩培養した。生育してきたコロニーの幾つかをLB寒天培地上でコロニー分離し、再度1g/lのMMを含むディビスマニジオリ最小培地での生育を確認した。この操作を9回独立を行い、6個の独立した耐性株を得て、それぞれをWMM4、WMM5、WMM6、WMM7、WMM8、及びWMM9と名付けた。

【0080】

これらの耐性株から染色体DNAを調製した。これを鑄型として配列番号21及び22に示す配列を有するプライマーを用いてPCR反応を行いmetA遺伝子の増

幅を行った。この増幅断片の塩基配列を配列番号21及び22に示した増幅用プライマー、並びに配列番号23及び24に示す配列を有するプライマーを用いて決定した。耐性株のmeta塩基配列は、配列番号25に示す野生型metaの塩基配列上で、WMM4株では887番目のチミンがグアニンに、WMM5株では893番目のシトシンがチミンに、WMM6株では野生型、WMM7及びWMM8株では886番目から890番目の塩基に相当するATCTCなる配列が反復して存在しその間に約1300塩基からなるIS2と呼ばれる挿入配列 (Ghosal, D. et al., Nucleic Acids Res. 6, 1111-1122 (1979)) が存在し、WMM9株では79番目のシトシンがチミンに変化していた。この結果、配列番号26に示したHTSのアミノ酸配列において、WMM4株のHTSは296番目のイソロイシンがセリンに、WMM5株では298番目のプロリンがロイシンに、WMM7及びWMM8株では挿入配列によって298番目のプロリン以降がアルギニン-ロイシン-アラニン-プロリンからなる配列に、WMM9株では27番目のアルギニンがシステインに変化していることが明らかとなった。

【0081】

meta構造遺伝子に変異が認められたWMM4、WMM5、WMM9、及びWMM7株をLB培地にて37°Cで一晩試験管培養した培養液1mlを5,000rpmで10分間遠心した後、1mlの0.9%の食塩水で2度洗浄した。これを1mlの0.9%の食塩水に懸濁し、0.5mlを50mlの最少培地に植菌し、37°Cで一日培養した。培養液を8,000rpmで10分間遠心した後、1mlの0.9%の食塩水で2度洗浄した。得られた菌体を3mlの50mMリン酸カリウム (pH7.5)、1mMジチオスレイトールからなる緩衝液に懸濁し、実施例1に示したのと同じ操作を行い粗酵素抽出液を得た。粗酵素抽出液中のHTS活性を、阻害剤の存在下で実施例1に記載の反応組成で測定した結果を、表2に示した。WMM7株については活性を検出することが出来なかったが、これは挿入配列によるアミノ酸配列の変化により比活性が大きく低下したものと考えられた。それ以外の株の比活性は野生株の約1/4程度であった。MMによる阻害はWMM4、WMM5、及びWMM9株のいずれにおいても解除されており、L-メチオニンによる阻害もかなり緩和していた。SAMによる阻害はWMM9株でほとんど解除が認められなかったが、WMM4及びWMM5株では解除する傾向が認められた。野生株HTS活性に最も強力な阻害を示したL-メチオニン及びSAMの組合せもWMM4及びWMM5株で顯

著な緩和が認められた。

【0082】

【表3】

表3：各種阻害剤存在下におけるMM耐性株由来のHTSの活性

阻害剤	HTS活性 (mmol/min/mg蛋白質)				
	W3110	WMM9	WMM4	WMM5	WMM7
非添加	22.3	5.0	4.5	4.5	0.0
0.1mM MM	18.6	4.9	4.1	4.6	0.0
1mM MM	7.0	2.7	4.6	4.8	0.0
0.1mM Met	14.3	2.5	4.5	4.2	0.0
1mM Met	0.8	2.2	4.0	4.0	0.0
0.1mM SAM	17.0	1.1	4.6	3.6	0.0
1mM SAM	3.0	0.5	2.6	3.3	0.0
0.1mM SAM+0.1mM Met	0.0	0.9	5.6	2.8	0.0

【0083】

【実施例5】変異型metaの導入によるL-メチオニン生産

実施例4で得られたmetaの変異株のうち、WMM9株、WMM4株、及びWMM5株の染色

体DNAを錆型とし、配列番号21及び配列番号22記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてそれぞれPCR反応を行い、meta遺伝子を含む断片を増幅した。この増幅断片は、両端にSphI及びSalIの認識配列が導入されている。この増幅断片の両端をSphI及びSalIで切断し、SphI及びSalIで切断したpHSG398にクローニングした。挿入断片の塩基配列を決定し、変異点を確認した。このプラスミドのSphI及びSalIによる切断物、実施例1に記載のスレオニンプロモーターのHindIII及びSphIによる切断物、及びHindIII及びSalIで切断したpMW118（日本ジーン社製）を混合後、連結反応を行った。この反応液でJM109株を形質転換し、形質転換体からプラスミドを抽出した。得られた組換えプラスミドから3者が連結されたプラスミドを選択した。これらをそれぞれpMWPthrmeta-9、pMWPthrmeta-4、及びpMWPthrmeta-5と名付けた。

【0084】

さらに各変異型meta遺伝子の変異点を組合わせるため、部位特異的変異導入をMutan-Super Express Km（宝酒造社製）を用いてその指示に従って行った。配列番号27記載の配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて、meta-4変異にmeta-9変異を組合わせてpMWPthrmeta-9+4を作製した。同様にmeta-5変異にmeta-9変異を組合わせてpMWPthrmeta-9+5を作製した。さらに配列番号28記載の配列を有するオリゴヌクレオチドを用いて、meta-9変異にmeta-4及びmeta-5変異を組合わせてpMWPthrmeta-9+4+5を作製した。

【0085】

これらのプラスミドを用いてW△BC△JK-32株を形質転換し、形質転換体を得た。各形質転換体を、50mg/lのアンピシリンを含むLBプレート上、37℃で一晩培養した。菌体をグルコース40g/l、硫酸マグネシウム1g/l、硫安16g/l、リン酸二水素カリウム1g/l、酵母抽出物（Bacto Yeast-Extract (Difco) 2g/l、硫酸マンガン0.01g/l、硫酸鉄0.01g/l、炭酸カルシウム30g/l、アンピシリン50mg/l、L-スレオニン0.5g/lを含むpH7の培地20mlに植菌し、37℃で48時間培養した。培養物から菌体を除き、アミノ酸分析計（日立社製）にてL-メチオニン量を測定した。この結果を表4に示した。L-メチオニン蓄積量は、野生型metaを導入した株に比べて、変異型のmetaを導入した株では数倍増加した。さらに変異を組

合わせることによって、L-メチオニン生産量のさらなる増加が認められた。

【0086】

【表4】

表4：変異型metA導入株のL-メチオニン生産量

菌 株	L-メチオニン生成量 (g/l)
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-W	0.023
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-9	0.158
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-4	0.108
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-5	0.131
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-9+4	0.206
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-5+9	0.207
WΔBCΔJK-32/pMWPthrmetA-9+4+5	0.236

【0087】

【発明の効果】

本発明により、L-メチオニン生産能を有する微生物が提供される。同微生物は、L-メチオニン生産菌として、また、L-メチオニン生産菌の育種の材料として利用することができる。

本発明の変異型metA遺伝子は、L-メチオニン及びSAMによる協奏阻害が解除されているので、L-メチオニン生産菌の育種に利用することができる。

【0088】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Ltd)

<120> 発酵法によるL-メチオニンの製造法 (Method for Producing L-Methionine by Fermentation)

<130> P-6041

<141> 1998-11-17

<160> 29

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0089】

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 1

gggaattctg gcaggaggaa ctggcgca

28

【0090】

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

gggtcgacgc tcatattggc actggaag

28

【0091】

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

gggtcgacat cagtaaaatc tattcatt

28

【0092】

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

ggaagcttgc ccgagggaaa gatctgtt

28

【0093】

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

ggccatgcc aggaaacttc atcacatg

28

【0094】

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

g g g a a t t c t c a t g g t t g c g g c g t g a g a g

28

[0 0 9 5]

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

g g a a g c t t g c g t g a g a t g g g g a t t a a c c

28

[0 0 9 6]

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

g g g a a t t c t a c t g c t a g c t g c t c t t g c g

28

[0 0 9 7]

<210> 9

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

ggaagcttaa aattttattg acttaggtca ctaaatactt taaccaatat aggcatagcg 60
cacagacgca tgccc 75

【0098】

<210> 10

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

ggccatgcgt ctgtgcgcta tgcctatatt ggttaaagta ttttagtgacc taagtcaata 60
aaattttaag cttcc 75

【0099】

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

caacagtttg agctaacc 18

【0100】

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

gcggttttt tgccggatgc

20

【0101】

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

tcggctacgc aactaattg

18

【0102】

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

gagaatgcac cgccacccg

18

【0103】

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15

tggcgcgta cggcg 18

[0104]

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

gcacgtcggt ttcattag 18

[0105]

<210> 17

<211> 1155

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1152)

<400> 17

atg gca aaa cac ctt ttt acg tcc gag tcc gtc tct gaa ggg cat cct 48

Met Ala Lys His Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Ser Glu Gly His Pro

1

5

10

15

gac aaa att gct gac caa att tct gat gcc gtt tta gac gcg atc ctc 96

Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser Asp Ala Val Leu Asp Ala Ile Leu

20

25

30

gaa cag gat ccg aaa gca cgc gtt gct tgc gaa acc tac gta aaa acc 144

Glu Gln Asp Pro Lys Ala Arg Val Ala Cys Glu Thr Tyr Val Lys Thr

35

40

45

ggc atg gtt tta gtt ggc ggc gaa atc acc acc agc gcc tgg gta gac 192
 Gly Met Val Leu Val Gly Gly Glu Ile Thr Thr Ser Ala Trp Val Asp
 50 55 60
 atc gaa gag atc acc cgt aac acc gtt cgc gaa att ggc tat gtg cat 240
 Ile Glu Glu Ile Thr Arg Asn Thr Val Arg Glu Ile Gly Tyr Val His
 65 70 75 80
 tcc gac atg ggc ttt gac gct aac tcc tgt gcg gtt ctg agc gct atc 288
 Ser Asp Met Gly Phe Asp Ala Asn Ser Cys Ala Val Leu Ser Ala Ile
 85 90 95
 ggc aaa cag tct cct gac atc aac cag ggc gtt gac cgt gcc gat ccg 336
 Gly Lys Gln Ser Pro Asp Ile Asn Gln Gly Val Asp Arg Ala Asp Pro
 100 105 110
 ctg gaa cag ggc gcg ggt gac cag ggt ctg atg ttt ggc tac gca act 384
 Leu Glu Gln Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr
 115 120 125
 aat gaa acc gac gtg ctg atg cca gca cct atc acc tat gca cac cgt 432
 Asn Glu Thr Asp Val Leu Met Pro Ala Pro Ile Thr Tyr Ala His Arg
 130 135 140
 ctg gta cag cgt cag gct gaa gtg cgt aaa aac ggc act ctg ccg tgg 480
 Leu Val Gln Arg Gln Ala Glu Val Arg Lys Asn Gly Thr Leu Pro Trp
 145 150 155 160
 ctg cgc ccg gac gcg aaa agc cag gtg act ttt cag tat gac gac ggc 528
 Leu Arg Pro Asp Ala Lys Ser Gln Val Thr Phe Gln Tyr Asp Asp Gly
 165 170 175
 aaa atc gtt ggt atc gat gct gtc gtg ctt tcc act cag cac tct gaa 576
 Lys Ile Val Gly Ile Asp Ala Val Val Leu Ser Thr Gln His Ser Glu
 180 185 190
 gag atc gac cag aaa tcg ctg caa gaa gcg gta atg gaa gag atc atc 624
 Glu Ile Asp Gln Lys Ser Leu Gln Glu Ala Val Met Glu Glu Ile Ile

195	200	205	
aag cca att ctg ccc gct gaa tgg ctg act tct gcc acc aaa ttc ttc			672
Lys Pro Ile Leu Pro Ala Glu Trp Leu Thr Ser Ala Thr Lys Phe Phe			
210	215	220	
atc aac ccg acc ggt cgt ttc gtt atc ggt ggc cca atg ggt gac tgc			720
Ile Asn Pro Thr Gly Arg Phe Val Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp Cys			
225	230	235	240
ggt ctg act ggt cgt aaa att atc gtt gat acc tac ggc ggc atg gcg			768
Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly Gly Met Ala			
245	250	255	
cgt cac ggt ggc ggt gca ttc tct ggt aaa gat cca tca aaa gtg gac			816
Arg His Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val Asp			
260	265	270	
cgt tcc gca gcc tac gca gca cgt tat gtc gcg aaa aac atc gtt gct			864
Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Tyr Val Ala Lys Asn Ile Val Ala			
275	280	285	
gct ggc ctg gcc gat cgt tgt gaa att cag gtt tcc tac gca atc ggc			912
Ala Gly Leu Ala Asp Arg Cys Glu Ile Gln Val Ser Tyr Ala Ile Gly			
290	295	300	
gtg gct gaa ccg acc tcc atc atg gta gaa act ttc ggt act gag aaa			960
Val Ala Glu Pro Thr Ser Ile Met Val Glu Thr Phe Gly Thr Glu Lys			
305	310	315	320
gtg cct tct gaa caa ctg acc ctg ctg gta cgt gag ttc ttc gac ctg			1008
Val Pro Ser Glu Gln Leu Thr Leu Leu Val Arg Glu Phe Phe Asp Leu			
325	330	335	
cgc cca tac ggt ctg att cag atg ctg gat ctg ctg cac ccg atc tac			1056
Arg Pro Tyr Gly Leu Ile Gln Met Leu Asp Leu Leu His Pro Ile Tyr			
340	345	350	
aaa gaa acc gca gca tac ggt cac ttt ggt cgt gaa cat ttc ccg tgg			1104

Lys Glu Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu His Phe Pro Trp
 355 360 365
 gaa aaa acc gac aaa gcg cag ctg ctg cgc gat gct gcc ggt ctg aag 1152
 Glu Lys Thr Asp Lys Ala Gln Leu Leu Arg Asp Ala Ala Gly Leu Lys
 370 375 380
 taa 1155
 [0106]
 <210> 18
 <211> 384
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 18
 Met Ala Lys His Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Ser Glu Gly His Pro
 1 5 10 15
 Asp Lys Ile Ala Asp Gln Ile Ser Asp Ala Val Leu Asp Ala Ile Leu
 20 25 30
 Glu Gln Asp Pro Lys Ala Arg Val Ala Cys Glu Thr Tyr Val Lys Thr
 35 40 45
 Gly Met Val Leu Val Gly Gly Glu Ile Thr Thr Ser Ala Trp Val Asp
 50 55 60
 Ile Glu Glu Ile Thr Arg Asn Thr Val Arg Glu Ile Gly Tyr Val His
 65 70 75 80
 Ser Asp Met Gly Phe Asp Ala Asn Ser Cys Ala Val Leu Ser Ala Ile
 85 90 95
 Gly Lys Gln Ser Pro Asp Ile Asn Gln Gly Val Asp Arg Ala Asp Pro
 100 105 110
 Leu Glu Gln Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr
 115 120 125
 Asn Glu Thr Asp Val Leu Met Pro Ala Pro Ile Thr Tyr Ala His Arg

130	135	140
Leu Val Gln Arg Gln Ala Glu Val Arg Lys Asn Gly Thr Leu Pro Trp		
145	150	155
Leu Arg Pro Asp Ala Lys Ser Gln Val Thr Phe Gln Tyr Asp Asp Gly		
165	170	175
Lys Ile Val Gly Ile Asp Ala Val Val Leu Ser Thr Gln His Ser Glu		
180	185	190
Glu Ile Asp Gln Lys Ser Leu Gln Glu Ala Val Met Glu Glu Ile Ile		
195	200	205
Lys Pro Ile Leu Pro Ala Glu Trp Leu Thr Ser Ala Thr Lys Phe Phe		
210	215	220
Ile Asn Pro Thr Gly Arg Phe Val Ile Gly Gly Pro Met Gly Asp Cys		
225	230	235
Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly Gly Met Ala		
245	250	255
Arg His Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser Lys Val Asp		
260	265	270
Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Ala Arg Tyr Val Ala Lys Asn Ile Val Ala		
275	280	285
Ala Gly Leu Ala Asp Arg Cys Glu Ile Gln Val Ser Tyr Ala Ile Gly		
290	295	300
Val Ala Glu Pro Thr Ser Ile Met Val Glu Thr Phe Gly Thr Glu Lys		
305	310	315
Val Pro Ser Glu Gln Leu Thr Leu Leu Val Arg Glu Phe Phe Asp Leu		
325	330	335
Arg Pro Tyr Gly Leu Ile Gln Met Leu Asp Leu Leu His Pro Ile Tyr		
340	345	350
Lys Glu Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg Glu His Phe Pro Trp		
355	360	365

Glu Lys Thr Asp Lys Ala Gln Leu Leu Arg Asp Ala Ala Gly Leu Lys

370

375

380

【0107】

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 19

ggaagcttaa gcagagatgc agagtgcg

28

【0108】

<210> 20

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

ggaagcttgg tgcggataa gaggccac

28

【0109】

<210> 21

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 21

ggcgtatgtc tagtgaggta atcagggtt

28

【0110】

<210> 22

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 22

gggtcgactt aatccagcgt tggattca

28

【0111】

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 23

tgtctgctgg gcggta

18

【0112】

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 24

agagagttt tcggtg

18

【0113】

<210> 25

<211> 930

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(927)

<400> 25

atg	ccg	att	cgt	gtg	ccg	gac	gag	cta	ccc	gcc	gtc	aat	ttc	ttg	cgt	48
Met	Pro	Ile	Arg	Val	Pro	Asp	Glu	Leu	Pro	Ala	Val	Asn	Phe	Leu	Arg	
1	5				10							15				
gaa	gaa	aac	gtc	ttt	gtg	atg	aca	act	tct	cgt	gcg	tct	ggt	cag	gaa	96
Glu	Glu	Asn	Val	Phe	Val	Met	Thr	Thr	Ser	Arg	Ala	Ser	Gly	Gln	Glu	
20			25									30				
att	cgt	cca	ctt	aag	gtt	ctg	atc	ctt	aac	ctg	atg	ccg	aag	aag	att	144
Ile	Arg	Pro	Leu	Lys	Val	Leu	Ile	Leu	Asn	Leu	Met	Pro	Lys	Lys	Ile	
35			40									45				
gaa	act	gaa	aat	cag	ttt	ctg	cgc	ctg	ctt	tca	aac	tca	cct	ttg	cag	192
Glu	Thr	Glu	Asn	Gln	Phe	Leu	Arg	Leu	Leu	Ser	Asn	Ser	Pro	Leu	Gln	
50			55									60				
gtc	gat	att	cag	ctg	ttg	cgc	atc	gat	tcc	cgt	gaa	tcg	cgc	aac	acg	240
Val	Asp	Ile	Gln	Leu	Leu	Arg	Ile	Asp	Ser	Arg	Glu	Ser	Arg	Asn	Thr	
65			70									75			80	
ccc	gca	gag	cat	ctg	aac	aac	ttc	tac	tgt	aac	ttt	gaa	gat	att	cag	288
Pro	Ala	Glu	His	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Cys	Asn	Phe	Glu	Asp	Ile	Gln	
85			90									95				
gat	cag	aac	ttt	gac	ggt	ttg	att	gta	act	ggt	gcg	ccg	ctg	ggc	ctg	336
Asp	Gln	Asn	Phe	Asp	Gly	Leu	Ile	Val	Thr	Gly	Ala	Pro	Leu	Gly	Leu	
100			105									110				
gtg	gag	ttt	aat	gat	gtc	gct	tac	tgg	ccg	cag	atc	aaa	cag	gtg	ctg	384

Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu
 115 120 125
 gag tgg tcg aaa gat cac gtc acc tcg acg ctg ttt gtc tgc tgg gcg 432
 Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala
 130 135 140
 gta cag gcc gcg ctc aat atc ctc tac ggc att cct aag caa act cgc 480
 Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg
 145 150 155 160
 acc gaa aaa ctc tct ggc gtt tac gag cat cat att ctc cat cct cat 528
 Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His
 165 170 175
 gcg ctt ctg acg cgt ggc ttt gat gat tca ttc ctg gca ccg cat tcg 576
 Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser
 180 185 190
 cgc tat gct gac ttt ccg gca gcg ttg att cgt gat tac acc gat ctg 624
 Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu
 195 200 205
 gaa att ctg gca gag acg gaa gaa ggg gat gca tat ctg ttt gcc agt 672
 Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser
 210 215 220
 aaa gat aag cgc att gcc ttt gtg acg ggc cat ccc gaa tat gat gcg 720
 Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala
 225 230 235 240
 caa acg ctg gcg cag gaa ttt ttc cgc gat gtg gaa gcc gga cta gac 768
 Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp
 245 250 255
 ccg gat gta ccg tat aac tat ttc ccg cac aat gat ccg caa aat aca 816
 Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr
 260 265 270

ccg cga gcg agc tgg cgt agt cac ggt aat tta ctg ttt acc aac tgg 864
 Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp
 275 280 285

ctc aac tat tac gtc tac cag atc acg cca tac gat cta cgg cac atg 912
 Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met
 290 295 300

aat cca acg ctg gat taa 930
 Asn Pro Thr Leu Asp
 305

【0114】

<210> 26

<211> 309

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 26

Met Pro Ile Arg Val Pro Asp Glu Leu Pro Ala Val Asn Phe Leu Arg

1 5 10 15

Glu Glu Asn Val Phe Val Met Thr Thr Ser Arg Ala Ser Gly Gln Glu

20 25 30

Ile Arg Pro Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Leu Met Pro Lys Lys Ile

35 40 45

Glu Thr Glu Asn Gln Phe Leu Arg Leu Leu Ser Asn Ser Pro Leu Gln

50 55 60

Val Asp Ile Gln Leu Leu Arg Ile Asp Ser Arg Glu Ser Arg Asn Thr

65 70 75 80

Pro Ala Glu His Leu Asn Asn Phe Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Ile Gln

85 90 95

Asp Gln Asn Phe Asp Gly Leu Ile Val Thr Gly Ala Pro Leu Gly Leu

100 105 110

Val Glu Phe Asn Asp Val Ala Tyr Trp Pro Gln Ile Lys Gln Val Leu
 115 120 125
 Glu Trp Ser Lys Asp His Val Thr Ser Thr Leu Phe Val Cys Trp Ala
 130 135 140
 Val Gln Ala Ala Leu Asn Ile Leu Tyr Gly Ile Pro Lys Gln Thr Arg
 145 150 155 160
 Thr Glu Lys Leu Ser Gly Val Tyr Glu His His Ile Leu His Pro His
 165 170 175
 Ala Leu Leu Thr Arg Gly Phe Asp Asp Ser Phe Leu Ala Pro His Ser
 180 185 190
 Arg Tyr Ala Asp Phe Pro Ala Ala Leu Ile Arg Asp Tyr Thr Asp Leu
 195 200 205
 Glu Ile Leu Ala Glu Thr Glu Glu Gly Asp Ala Tyr Leu Phe Ala Ser
 210 215 220
 Lys Asp Lys Arg Ile Ala Phe Val Thr Gly His Pro Glu Tyr Asp Ala
 225 230 235 240
 Gln Thr Leu Ala Gln Glu Phe Phe Arg Asp Val Glu Ala Gly Leu Asp
 245 250 255
 Pro Asp Val Pro Tyr Asn Tyr Phe Pro His Asn Asp Pro Gln Asn Thr
 260 265 270
 Pro Arg Ala Ser Trp Arg Ser His Gly Asn Leu Leu Phe Thr Asn Trp
 275 280 285
 Leu Asn Tyr Tyr Val Tyr Gln Ile Thr Pro Tyr Asp Leu Arg His Met
 290 295 300
 Asn Pro Thr Leu Asp
 305

【0115】

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 27

ccagacgcac aagaagttgt c

21

【0116】

<210> 28

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 28

tagatcgat agcgtgctct ggttagac

27

【0117】

<210> 29

<211> 309

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 29

Ala Met Leu Pro Val

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 L-メチオニン生産能を有する微生物を育種し、同微生物を用いて発酵法によりL-メチオニンを製造する。

【解決手段】 L-メチオニン生合成系のリプレッサーを欠損し、及び／又は、細胞内のホモセリントラヌサクシニラーゼ活性が増強され、好ましくは、さらに細胞内のS-アデノシルメチオニンシンテース活性が弱化し、L-スレオニン要求性を示し、細胞内のシスタチオニンγ-シンテース活性及びアスパルトキナーゼ-ホモセリンデヒドロゲナーゼII活性が増強された微生物を培地に培養し、培地中にL-メチオニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することにより、L-メチオニンを製造する。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【住所又は居所】 東京都中央区京橋1丁目15番1号

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【住所又は居所】 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマ
ビル6階 秀和特許法律事務所

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【住所又は居所】 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマ
ビル6階 秀和特許法律事務所

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【住所又は居所】 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマ
ビル6階 秀和特許法律事務所

【氏名又は名称】 川口 嘉之

出願人履歴情報

識別番号 [00000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号

氏 名 味の素株式会社